

Зайнуллин Алмаз Анасович

**АУТОАНТИТЕЛА К НУКЛЕИНОВЫМ КИСЛОТАМ
ПРИ ИММУНОКОНФЛИКТНОЙ БЕРЕМЕННОСТИ**

03.00.04 - биохимия

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2003

Работа выполнена на кафедре биохимии Казанского государственного университета и лаборатории генной диагностики Татарского научно-исследовательского института сельского хозяйства

Научные руководители: доктор биологических наук,
профессор Винтер В.Г.
кандидат медицинских наук,
Абдрахманова Л.Р.

Официальные оппоненты: академик АН РТ, доктор
медицинских наук
профессор Зубаиров Д.М.
доктор биологических наук,
Чернова О.А.

Ведущая организация: Казанская государственная
Медицинская Академия, г. Казань

Защита диссертации состоится 15.05 2003 г. в 14⁰⁰ ч. на заседании диссертационного Совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина, по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18

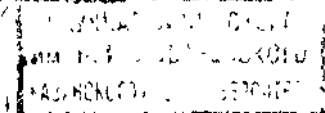
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета

Автореферат разослан 25 апреля 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета

Кандидат биологических наук

Аскар А.Н. - Аскар А.Н.



СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время наблюдается рост рождения детей с гемолитической болезнью новорожденных (ГБН), поэтому уменьшение риска Rh-аллоиммунизации у резус-отрицательных (Rh(-)) матерей, а также своевременная диагностика, оценка степени тяжести и лечение этого заболевания представляют важную проблему для здравоохранения. По данным доклада Минздрава России в г. Курске на II Российском съезде медицинских генетиков (2000 г.) ГБН в России занимает III место среди заболеваний после врожденных пороков развития и респираторных нарушений у новорожденных. Анализ динамики заболевания среди недоношенных новорожденных в родильном отделении РКБ республики Татарстан показал, что с 1994 г. ГБН увеличилась с 2,9% до 8,33% и занимает II-III место после внутрочерепных родовых травм (61,67%), внутриматочной гипоксии и асфиксии (8,33%) (Рыбкина, 1999).

Одной из основных причин данного заболевания является резус-аллоиммунизация - тяжелая патология перинатального и постнатального периода, приводящая к мертворождению, ранней детской смертности и инвалидизации детей в виду отсутствия массовой профилактики анти-резусным иммуноглобулином после родов и абортот у Rh(-) беременных. Скрининговые программы по пренатальной диагностике резус-аллоиммунизации у Rh(-) беременных существуют во многих странах и включают как неинвазивные, так и инвазивные методы диагностики. К неинвазивным методам диагностики относятся - определение резус-антител (Rh-AT) изосерологическими методами у всех Rh(-) беременных, ультразвуковое исследование плода и плаценты (Абдрахманова и др., 2000; Branch, 1998; Huang, 1996). Инвазивные методы диагностики предполагают: амниоцентез с целью определения билирубина (Bi) околоплодных вод спектрофотометрическим методом (Moise, 1994) и диагностики Rh-принадлежности плода по амниоцитам с применением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Furundarena et al., 1999; Iskaros et al., 1998; Rahman et al., 1998). В ряде случаев применяется кордоцентез с целью определения гемоглобина, Bi, группы и Rh-принадлежности крови плода и степени тяжести гемолитической болезни плода (ГБП) (Михайлов, 1996).

В последнее время при диагностике репродуктивной патологии стали применять аутоиммунные маркеры - аутоантитела (ААТ) к хорионическому гонадотропину человека, фосфолипидам, нативной и денатурированной ДНК (нДНК и дДНК) (Тимохина и др., 2002; Шляхтенко и др., 2002). Практически неизученной является роль ААТ к нуклеиновым кислотам (НК) при иммуноконфликтной беременности - резус- и АВО- аллоиммунизации.

Целью настоящей работы явилось исследование уровня ААТ к НК в сыворотке крови при иммуноконфликтной беременности.

Были поставлены следующие задачи:

1. Определить пороговые уровни ($\bar{X} \pm 2\sigma$ и $\bar{X} \pm 3\sigma$) содержания ААТ к НК в сыворотке крови здоровых доноров для определения границ нормы и патологии.
2. Изучить содержание ААТ к НК в сыворотке крови беременных женщин и их детей при различных формах ГБП.
3. Исследовать влияние АВО-аллоиммунизации на уровень содержания ААТ к НК в сыворотке крови рожениц.
4. Разработать комплексный подход для диагностики различных форм ГБП с применением ИФА на ААТ к НК в сыворотке крови, а также Rh- и АВО- генотипирование плода методом ПЦР.

Научная новизна. Впервые проведены исследования методом ИФА по содержанию ААТ к РНК, нДНК и дДНК в сыворотке крови беременных и женщин, родивших детей с гемолитической болезнью (ГБ) по Rh - и АВО- системе.

Была выявлена прямая зависимость между уровнем ААТ к РНК и тяжестью заболевания при внутриутробной форме ГБП.

Установлено, что изменение уровня ААТ к РНК в сыворотке крови беременных женщин может служить показателем состояния фетоплацентарного барьера и являться значимым диагностическим критерием при внутриутробных и анемической формах ГБП.

Практическая значимость. Установленные пороговые уровни содержания ААТ к НК в сыворотке крови здоровых доноров могут быть использованы для определения границ нормы и патологического состояния.

Наличие повышенного уровня ААТ к РНК характерное при внутриутробной и анемичной форме ГБП может использоваться как критерий для оценки тяжести заболевания при иммуноконфликтной беременности.

Применение метода ПЦР и ПДРФ на определение Rh- и АВО-принадлежности плода способствует точной диагностике ГБП.

Использованные методы диагностики ААТ к НК в сыворотке крови иммуноконфликтных беременных женщин и определение Rh- и АВО-принадлежности плода методом ПЦР и ПДРФ были апробированы при обследовании беременных женщин в условиях межрегионального медико-генетического центра РКБ РТ.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены в докладах на II (IY) российском съезде медицинских генетиков (Курск, 2000), на юбилейной конференции КНИИГЭМ (Казань, 2000), на VI всероссийской научной конференции Молекулярные основы иммунорегуляции, иммунодиагностики и иммунотерапии (Санкт-Петербург, 2002), на республиканской конференции «Резус-конфликтная беременность» (Казань, 2002), а также на II международном симпозиуме «Резус-конфликтная беременность» (Казань, 2002).

конференции «Experimental and Clinical Reproductive Immunobiology» (Amsterdam, 2000).

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 8 опубликованных работах.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 136 страницах, содержит 14 таблиц и 10 рисунков. Список литературы включает 226 наименований, из которых 54 отечественных и 172 иностранных работ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Беременные женщины, их дети и здоровые доноры. В работе анализировали сыворотку крови 57 беременных женщин, проходящих обследование в медико-генетическом центре РКБ, 69 рожениц и 67 новорожденных детей с резус-аллоиммунизацией из родильного отделения РКБ г. Казани. Анализировали сыворотки крови 250 здоровых людей в возрасте от 16 до 60 лет без клинических симптомов аутоиммунных заболеваний из донорских пунктов КНИИЭМ и РКБ.

Амниотическая жидкость (АЖ) забиралась под ультразвуковым контролем в условиях стационара РКБ у беременных женщин с высоким риском ГБП на 20-37 неделях беременности.

Определение резус-принадлежности плода методом ПЦР проводилась по методике, предложенная Bennett с соавторами (Bennet et al., 1993), с нашими изменениями, Праймеры A1 и A2 специфично амплифицируют 136 нуклеотидный фрагмент ДНК RhCcEe и RhD генов (7 экзон). Вторая пара праймеров, A3 и A4, амплифицирует 186 нуклетидный фрагмент ДНК RhD гена (10 экзон). Для RhD(+) генотипа характерно наличие 136 и 186 нуклеотидных продуктов (н.п.) амплификации, для RhD(-) только 136 н.п. ДНК выделяли из цельной крови из амниоцитов плода. Объем амплификационной смеси составлял 50 мкл, которая содержала 1-2 мкл человеческой геномной ДНК, по 20 рМ каждого из четырех праймеров, 10 мМ Трис-HCl буфер (рН 8,3), 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 0,1% TritonX-100, 200 мкМ NTP, 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы.

ПЦР проводили на термочиклере «Терцик» («ДНК-Технология», Москва): предварительная денатурация - 2 мин при 94°C; затем 30 циклов денатурации - 1 мин при 94°C, отжига праймеров - 1 мин при 56°C, элонгации ДНК - 1 мин при 72°C; конечная элонгация - 8 мин при 72°C.

Продукты амплификации разделялись при помощи электрофореза в 3% агарозном геле, содержащем 0,5 мг/мл этидиум бромид, в 0,01

М ТБЕ-буфере, pH 8,3, при 150 В в течение 1 ч. Для оценки размеров полученных фрагментов ДНК использовался стандартный маркер длиной 100-1000 н.п. («Сибэнзим», Новосибирск). Результат визуализировали в УФ-свете при $\lambda=310$ нм.

Определение ABO-групп крови методом ПЦР и полиморфизма рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) делали согласно методике, опубликованной Tun с соавторами (Tun et al., 1996). ДНК выделяли из цельной крови из амниоцитов плода. Проводили амплификацию 2 локусов ABO-гена: праймеры ABO1+ABO2 амплифицировали фрагмент размером 200 н.п., праймеры ABO3+ABO4 амплифицировали фрагмент размером 128 н.п. гена А-трансферазы. Амплификация проходила в смесях в тех же объемах и при таких же условиях, как и при определении резус-принадлежности.

Затем 10 мкл пробы после ПЦР (содержащую фрагменты ДНК 200 и 128 н.п.) инкубировали с рестриказами AluI и KpnI («Сибэнзим», Новосибирск), по 5 ед. каждой, при 37°C в течение 1,5 ч. ДНК-фрагменты после рестрикции разделяли электрофорезом в 10% полиакриламидном геле, в 0,01 М ТБЕ-буфере, pH 8,3, при 500 В в течение 1 ч. После электрофореза проводилось окрашивание геля раствором этидия бромид (1мг/мл) в 0,01 М ТБЕ-буфере, pH 8,3, в течение 20 мин и визуализация в УФ-свете при $\lambda=310$ нм. Для оценки размеров полученных фрагментов ДНК использовался стандартный маркер длиной 100-1000 н.п. («Сибэнзим», Новосибирск).

ААТ к НК в сыворотке крови определяли методом ИФА на полистироловых планшетах НПО «Полимед», г. С.Петербург (Саттарова и др., 1994; Зайнуллина и др., 2000). Для сравнения воспроизводимости результатов в качестве стандарта использовали пул сывороток крови здоровых доноров с низким уровнем ААТ к НК. Полученные данные выражали в относительных единицах (отн. ед.), вычисленных по формуле:

ОП450-630 исследуемой сыворотки

отн. ед. = _____

ОП₄₅₀₋₆₃₀ стандарта

Измерения ОП проводили на приборе Opsys MR («Dynex», США) при длинах волны 450 и 630 нм.

В качестве РНК-антигена (АГ) использовали суммарную дрожжевую РНК (НПО «Вектор», г. Новосибирск). В качестве нДНК-АГ использовали коммерческий препарат ДНК (НПО «Вектор», г. Новосибирск). дДНК готовили прогреванием раствора ДНК (50 мкг/мл) с добавлением 0,05% формальдегида в течение 15 мин при 100°C с последующим быстрым охлаждением на ледяной бане.

Определение Rh-АТ серологическим методом проводили по методике - непрямой реакции Кумбса (Меньшиков, 1987). Уровень содержания АТ выражали в титрах.

Спектрофотометрическое определение Vi у новорожденных проводили по унифицированному методу по диазореакции в

присутствии акселератора (метод Ендрасика - Клеггорна - Профат. Концентрацию V_i в сыворотке крови выражали в мкмоль/л (Меньшиков, 1987).

Статистическая обработка полученных результатов выполнялась на персональном компьютере: Windows 98; Microsoft Excel 2000 (пакет статистических программ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружение ААТ к НК в сыворотке крови у здоровых людей. Результаты наших исследований показали, что уровень содержания ААТ к НК варьирует в широких пределах - от 0,1 до 2,3 отн. ед. Числовые показатели содержания ААТ соответствовали закону нормального распределения, поэтому при вычислении границ содержания ААТ в норме использовали формулы, принятые для этого вида распределения. Были вычислены средние (\bar{x}_n), стандартная ошибка (t), стандартное отклонение (a). Данные анализа частоты встречаемости индивидуальных уровней содержания ААТ к РНК в сыворотке крови среди обследованных лиц представлены на рисунке 1. У большинства (61%) здоровых людей уровень содержания ААТ к РНК находится в диапазоне 0,71 - 1,3 отн. ед., у 25% людей обнаруживается значительно более низкое (0,1-0,7 отн.ед.) и у 14% высокое (1,31-2,3 отн.ед.) содержание ААТ к РНК. Средний уровень содержания ААТ к РНК в сыворотке крови здоровых людей составил $0,95 \pm 0,01$ отн.ед., $\sigma = 0,25$ отн.ед. Для разграничения нормы от патологии, мы вычислили пороговые уровни ААТ к РНК в норме, которые составили: для $\bar{x}_n \pm 2\sigma$ - $0,95 \pm 0,50$ отн.ед. ($p < 0,05$) и для $\bar{x}_n \pm 3\sigma$ - $0,95 \pm 0,75$ отн.ед. ($p < 0,01$).

Уровень содержания ААТ к нДНК в сыворотке крови здоровых доноров находился в пределах 0,53-2,20 отн.ед. Средний уровень ААТ к нДНК составил $1,00 \pm 0,02$ отн.ед., а - 0,20 отн. ед., пороговый уровень нормы - $1,00 \pm 0,40$ отн.ед. ($\bar{x}_n \pm 2\sigma$) и $1,00 \pm 0,60$ отн.ед. ($\bar{x}_n \pm 3\sigma$). У 49% обследованных доноров уровень содержания ААТ к нДНК находится в диапазоне 0,7-1,1 отн.ед. Низкий уровень содержания антител (0,51-0,7 отн.ед.) обнаружен у 13% людей, а высокий уровень содержания ААТ к нДНК (1,1-2,2) у 35% здоровых доноров (рис.1.).

По распределению индивидуальных уровней содержания ААТ к дДНК складывается похожая картина. Средний уровень составил $1,12 \pm 0,02$ отн.ед., σ - 0,2 отн.ед. Значения варьируют от 0,5 до 2 отн. ед. Пороговый уровень ААТ к дДНК в норме составил $1,12 \pm 0,40$ отн.ед. ($\bar{x}_n \pm 2\sigma$) и $1,12 \pm 0,60$ отн.ед. ($\bar{x}_n \pm 3\sigma$). 46% доноров имеют диапазон значений уровней содержания ААТ от 0,71 до 1,1; 10% от 0,5 до 0,7 и 42% от 1,11 до 2 отн. ед. (рис.1.). Числовые данные содержания ААТ к дДНК и нДНК соответствовали закону нормального распределения.

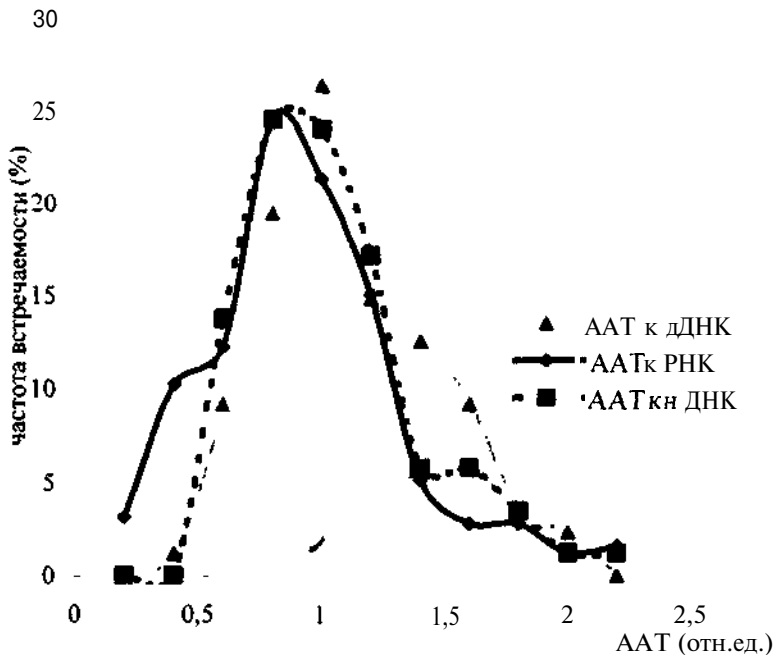


Рис. 1. График вариации ААТ к нуклеиновым кислотам в сыворотке крови здоровых доноров (%)

Таблица 1.

Уровень содержания ААТ к НК в сыворотке крови здоровых людей разных возрастных групп (отн.ед.)

Возрастные группы	Кол-во человек	ААТ к РНК	ААТ к нДНК	ААТ к дДНК
16-20	12	$1,12 \pm 0,16^H$	$0,87 \pm 0,08^H$	$0,87 \pm 0,77^H$
21-30	70	$0,99 \pm 0,09^H$	$1,06 \pm 0,06^H$	$1,14 \pm 0,06^H$
31-40	81	$0,93 \pm 0,03^H$	$1,07 \pm 0,07^H$	$1,26 \pm 0,14^H$
41-50	65	$1,03 \pm 0,05^H$	$1,11 \pm 0,09^H$	$1,19 \pm 0,08^H$
51-60	22	$0,91 \pm 0,07^H$	$0,91 \pm 0,18^H$	$0,91 \pm 0,13^H$
16-60	250	$0,95 \pm 0,01$	$1,00 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,02$

Различие по сравнению со средним значением в контрольной группе:

^H — не достоверно

Исследованная группа доноров была не однородная по возрасту и включала людей от 16 до 60 лет. Нами был проведен анализ уровня содержания ААТ к НК в сыворотке крови здоровых людей разных

возрастных групп (табл.1), но отличий от генеральной совокупности не было обнаружено ни в одной возрастной группе. Так же не обнаружено достоверных отличий при сравнении доноров, различающихся по группам крови и Rh-фактору (табл.2).

Таблица 2.
Зависимость уровня содержания ААТ к НК в сыворотке крови
здоровых людей от резус- и АВО- принадлежности (отн.ед.)

Обследуемые доноры	Кол-во человек	ААТ к РНК	ААТ к нДНК	ААТ к дДНК
Rh(+)	78	$0,93 \pm 0,05$ "	$1,05 \pm 0,04$ "	$1,16 \pm 0,05$ "
Rh(-)	7	$0,94 \pm 0,20$ "	$1,17 \pm 0,23$ "	$1,14 \pm 0,19$ "
O (I)	22	$0,98 \pm 0,10$ "	$1,16 \pm 0,08$ "	$1,16 \pm 0,07$ "
A (II)	29	$0,86 \pm 0,07$ "	$1,05 \pm 0,07$ "	$1,21 \pm 0,13$ "
B (III)	14	$0,95 \pm 0,14$ "	$1,00 \pm 0,10$ "	$1,09 \pm 0,11$ "
AB (IV)	10	$0,95 \pm 0,16$ "	$0,98 \pm 0,09$ "	$1,07 \pm 0,08$ "
Здоровые доноры	250	$0,95 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,02$

Различие по сравнению со средним значением в контрольной группе:
" - не достоверно

Нами была обследована группа здоровых беременных женщин, совместимых с мужьями по группам крови. У здоровых беременных женщин на момент родов уровень аутоантител к нуклеиновым кислотам в сыворотке крови достоверно не отличался от показателей здоровых доноров и составил (в отн. ед.): к РНК - $1,07 \pm 0,10$; к нДНК - $0,94 \pm 0,09$; к дДНК - $0,98 \pm 0,14$. Эта обследованная группа рожениц была использована в качестве контроля при исследовании беременных женщин с различными формами резус- и АВО-аллоиммунизации (табл.3).

Обнаружение ААТ к НК в сыворотке иммуноконфликтных беременных женщин и их новорожденных детей. У беременных женщин, родивших детей с внутриутробной (ВФ) и анемической формой (АФ) ГБП наблюдается достоверное ($p < 0,05$) повышение уровня ААТ к РНК по сравнению с контрольной группой. Наиболее высокий уровень ААТ к РНК при Rh-конфликтной беременности был обнаружен в группе беременных с ВФ ГБП тяжелой степени - $2,15 \pm 0,26$ отн.ед. ($p < 0,01$) по сравнению с контролем (табл.3). При ВФ ГБП средней степени тяжести уровень ААТ к РНК в сыворотке крови беременных женщин составил $1,86 \pm 0,39$ отн.ед. ($p < 0,05$) по

Таблица 3.

Влияние степени тяжести и формы заболевания ГБ по Rh-системе на содержание АТ к НК и Rh-АТ в сыворотке крови беременных женщин и рожениц с иммуноконфликтами

Диагноз	ААТ к РНК (отн.ед.)	ААТ к нДНК (отн.ед.)	ААТ к дДНК (отн.ед.)	Титр Rh- АТ
ГБ желтушная ВФ, тяжелая степень	2,15±0,26**	1,03±0,08 ^н	0,99±0,09 ^н	1:16- 1:32
ГБ желтушная ВФ, средняя степень	1,86±0,39*	0,80±0,05 ^н	0,98±0,07 ^н	1:8-1:16
ГБ ВФ (общая)	2,07±0,22**	0,92±0,05 ^н	0,99±0,05 ^н	1:16
ГБ желтушная ПФ, тяжелая степень	0,97±0,2 ^н	1,11±0,70 ^н	0,62±0,25 ^н	1:8-1:16
ГБ желтушная ПФ, средняя степень	1,39±0,15 ^н	0,86±0,07 ^н	1,27±0,15 ^н	1:8
ГБ желтушная ПФ, легкая степень	1,30±0,20 ^н	0,74±0,12 ^н	1,02±0,25 ^н	1:4-1:8
ГБ ПФ (общая)	1,34±0,12 ^н	0,82±0,06 ^н	1,10±0,11 ^н	1:8
ГБ, анемическая форма	1,56±0,18*	0,94±0,08 ^н	0,92±0,15 ^н	1:8-1:16
Женщины с Rh-АТ во 2- й половине беременности, родивших детей с различными формами ГБ	1,48±0,10**	0,87±0,04 ^н	1,12±0,09 ^н	
Беременные совместимые с мужем по группам крови	1,07±0,10	0,94±0,09	0,98±0,14	
Здоровые доноры	0,95±0,02	1,00±0,02	1,12±0,02	

Различие по сравнению со средним значением в контрольной группе: * - достоверно при $p<0,05$; ** - достоверно при $p<0,01$; ^н - не достоверно

сравнению с контрольной группой (табл.3). При этом уровень ААТ к РНК в группах с послеродовой формой (ПФ) ГБН не имело достоверных отличий от уровня контроля независимо от степени тяжести заболевания. При сравнении общих групп беременных женщин с ВФ и ПФ ГБ были выявлены статистически достоверные различия ($p<0,01$) в уровне ААТ к РНК в сыворотке крови ($2,07\pm0,22$ и $1,34\pm0,12$ отн.ед. соответственно). Было отмечено достоверное повышение уровня ААТ к РНК в сыворотке крови в группе беременных с анемической формой ГБП $1,56\pm0,18$ отн.ед. ($p<0,05$) по сравнению с контролем (табл.3). Уровень содержания ААТ к нДНК и

лДНК в сыворотке крови у беременных с различными формами ГБ не превышал верхнего предела порогового уровня (табл.3).

Нами была выявлена тенденция увеличения среднего значения титра Rh-АТ в исследуемой группе беременных женщин от тяжести ГБП, индивидуальные же значения титров Rh-АТ при ГБП колебались в широких пределах и не зависели от тяжести заболевания (табл.3).

При исследовании Rh-конфликтных беременных, у которых при родах проявились различные формы ГБН, во 2-й половине беременности было выявлено повышение уровня содержания ААТ к РНК ($1,48 \pm 0,10$ отн. ед., $p < 0,05$). Уровень содержания ААТ к нДНК и лДНК в сыворотке крови у беременных и рожениц с различными формами ГБН не превышал верхнего предела порогового уровня (табл. 3).

Таблица 4.

Влияние АВО-аллоиммунизации у иммуноконфликтных беременных на уровень содержания ААТ к НК (отн. ед.)

Форма заболевания	ААТ к РНК	ААТ к нДНК	ААТ к лДНК
Беременные с АВО-аллоиммунизацией, родившие детей с ГБН по АВО-системе	$2,07 \pm 0,16^{**}$	$0,85 \pm 0,06^H$	$0,90 \pm 0,16^H$
Не совместимые по АВО, совместимые по Rh с ребенком	$3,55 \pm 0,81^{**}$	$1,53 \pm 0,39^H$	$1,20 \pm 0,40^H$
Не совместимые по Rh, совместимые по АВО с ребенком	$1,68 \pm 0,12^{**}$	$0,92 \pm 0,04^H$	$1,03 \pm 0,06^H$
Несовместимые по Rh и по АВО с ребенком	$1,96 \pm 0,19^{**}$	$0,83 \pm 0,06^H$	$1,02 \pm 0,09^H$
Контрольная группа (беременные совместимые с мужем по группам крови)	$1,07 \pm 0,10$	$0,94 \pm 0,09$	$0,98 \pm 0,14$
Здоровые доноры	$0,95 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,02$

Различие по сравнению со средним значением в контрольной группе:

*+ – достоверно при ^H ~ не достоверно

Выявлено влияние АВО-несовместимости на уровень ААТ к РНК в сыворотке крови беременных. АВО-несовместимость у Rh-конфликтных беременных приводила к дополнительному увеличению уровня ААТ к РНК (табл.4). Но наиболее высокое содержание ААТ к РНК наблюдался у беременных, родивших детей с ГБН по АВО-

системе совместимых по Rh-фактору - $3,55 \pm 0,81$ отн.ед. Повышенный уровень ААТ к РНК в этой группе выявлялся у 100% обследованных. Содержание ААТ к ДНК в обеих группах не превышало порогового уровня (табл.4).

Таким образом, увеличение уровня ААТ к РНК будет зависеть напрямую от барьерных функций плаценты, поэтому исследование уровня ААТ к РНК при Rh-аллоиммунизации является дополнительным неинвазивным критерием дородовой диагностики, определяющим степень нарушения фетоплацентарного барьера при Rh-аллоиммунизации.

В проведенных нами исследованиях АВО-несовместимость у Rh-конфликтных беременных женщин приводила к дополнительному увеличению уровня содержания ААТ к РНК (табл. 4). Однако при ГБН по АВО-несовместимости и совместимости по Rh-АГ наблюдается наиболее высокий уровень ААТ к РНК, превышая этот показатель при Rh-несовместимости в группе с тяжелой ВФ ГБН более чем в 1,5 раза. Полученные результаты согласуются с литературными данными о более высоком вкладе АВО-АГ, чем Rh-АГ в отягощенность при ГБН (Шабалов, 1997). Механизм развития АВО-аллоиммунизации отличается от Rh-аллоиммунизации. Первичной причиной АВО-аллоиммунизации являются перекрестные реакции с поверхностными АВО-подобными АГ различных микроорганизмов, в основном кишечной флоры. Поэтому АВО-конфликты могут возникать, на первый взгляд, непредсказуемо во время первой беременности, тогда как Rh-аллоиммунизация возникает чаще всего при повторных беременностях, либо после гемотрансфузий, поэтому изучение уровня ААТ к РНК при АВО-конфликтах может быть важным клиническим признаком для диагностики этой патологии.

Таблица 5.

Влияние отягощенного акушерского анамнеза (ОАА) на уровень содержания ААТ к НК у резус-конфликтных беременных (отн.ед.)

Диагноз	Кол-во	ААТ к РНК	ААТ к нДНК	ААТ к дДНК
Беременные без ОАА	32	$1,65 \pm 0,13^{**}$	$0,84 \pm 0,06^H$	$0,93 \pm 0,06^H$
Беременные с ОАА и гемотрансфузиями	23	$1,55 \pm 0,14^*$	$0,98 \pm 0,05^H$	$1,07 \pm 0,09^H$
Беременные совместимые с мужем по группам крови	8	$1,07 \pm 0,10$	$0,94 \pm 0,09$	$0,98 \pm 0,14$
Здоровые доноры	250	$0,95 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,02$

Различие по сравнению со средним значением в контрольной группе:

* – достоверно при $p < 0,05$; ** – достоверно при $p < 0,01$; ^H – не достоверно

Для того чтобы выяснить влияет ли отягощенный акушерский анамнез (ОАА) на повышение уровня содержания ААТ к РНК, нами были обследованы две группы: беременные женщины, у которых были предыдущие рождения детей с ГБН, мертворождения, отечные формы ГБП, гемотрансфузии несовместимой кровью, и беременные с **Rh-аллоиммунизацией** возникшей впервые при данной беременности. Было выявлено, что ОАА не влияет на содержание ААТ к РНК. У пациенток с ОАА и без ОАА было обнаружено повышенное содержание ААТ к РНК ($1,55 \pm 0,14$ и $1,65 \pm 0,13$ отн. ед. соответственно) по сравнению с контрольной группой. Разница в уровне ААТ к РНК в этих двух группах между собой была недостоверной. Повышение уровня ААТ к РНК в сыворотке крови беременных женщин с ОАА и гемотрансфузиями наблюдалось у 52% пациентов, в группе беременных женщин без ОАА высокий уровень ААТ к РНК был у 41% обследованных женщин. При этом содержание ААТ к ДНК не имело достоверных отличий от контрольных показателей (табл.5).

Таблица 6.

Содержание ААТ к НК у беременных с Rh-АТ, родивших детей без ГБН (отн.ед.)

Обследованные пациенты	ААТ к РНК	ААТ к нДНК	ААТ к дДНК
Беременные, родившие Rh(-) детей	$1,05 \pm 0,12''$	$0,84 \pm 0,08''$	$0,69 \pm 0,09''$
Rh(-) беременные родившие детей без ГБН, без Rh-антител	$0,90 \pm 0,08''$	$0,56 \pm 0,06^{**}$	$0,63 \pm 0,09^*$
Rh(+) беременные, несовместимые с мужем по группам крови	$1,13 \pm 0,18''$	$0,61 \pm 0,03^*$	$0,75 \pm 0,05''$
Беременные Rh(-) с наличием Rh-антител, родившие Rh(+) детей без ГБН	$1,09 \pm 0,14''$	$1,02 \pm 0,15''$	$0,95 \pm 0,12''$
Беременные совместимые с мужем по группам крови	$1,07 \pm 0,10$	$0,94 \pm 0,09$	$0,98 \pm 0,14$
Здоровые доноры	$0,95 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,02$

Различие по сравнению со средним значением в контрольной группе:

- достоверно при $p < 0,05$; ** - достоверно при $p < 0,01$; '' - не достоверно

Вероятно, повышение уровня ААТ к РНК не связано с предшествующей иммунизацией и, является, скорее всего, результатом проникновения РНК-АГ плода через плаценту и выработкой ААТ к РНК у матери во время текущей беременности. Это предположение подтверждается обнаружением повышенного

уровня ААТ к РНК у женщин со 2-й половины беременности с различными формами ГБП.

Содержание ААТ ко всем трем антинуклеарным АГ в сыворотке крови беременных, имевших в крови Rh-АТ и родивших детей без ГБН, не превышало верхнего предела порогового уровня, в некоторых случаях было обнаружено даже достоверное снижение уровня ААТ к нДНК и дДНК у Rh(-) беременных без Rh-АТ, родивших детей без ГБН ($0,56 \pm 0,06$ и $0,63 \pm 0,09$ отн.ед. соответственно) и ААТ к нДНК у Rh(+) беременных несовместимых с мужьями по группам крови ($0,61 \pm 0,03$ отн.ед.) по сравнению к контрольной группе (табл.6).

Таблица 7

Зависимость уровня содержания ААТ к НК от титра Rh-АТ у Rh-
конфликтных беременных

Титр Rh-АТ, определенных серологическим методом	Уровень ААТ к НК, определенных методом ИФА (отн.ед.)		
	АТ к РНК	АТ к нДНК	АТ к дДНК
1:2	$1,10 \pm 0,12$	$1,15 \pm 0,46$	$0,93 \pm 0,21$
1:4	$1,30 \pm 0,17$	$0,74 \pm 0,07$	$0,99 \pm 0,14$
1:8	$2,19 \pm 0,35$	$1,01 \pm 0,10$	$1,10 \pm 0,13$
1:16	$1,79 \pm 0,31$	$0,80 \pm 0,14$	$0,98 \pm 0,13$
1:32	$2,70 \pm 1,70$	$0,66 \pm 0,04$	$1,10 \pm 0,30$
1:64	$1,23 \pm 0,43$	$0,90 \pm 0,30$	$0,71 \pm 0,41$

При исследовании зависимости титра Rh-АТ, определяемых серологическим методом и уровня ААТ к РНК и ДНК, выявляемых методом ИФА, была обнаружена тенденция к повышению уровня ААТ к РНК с повышением титра Rh-АТ до 1:32 (табл.7). Однако при проведении корреляционного анализа индивидуальных сывороток крови с помощью программы Microsoft Excel 2000 не было обнаружено высокой степени корреляции между уровнем содержания ААТ к РНК и титром Rh-АТ.

Определение резус-статуса плода с помощью ПЦР. Для определения Rh-принадлежности пациентов использовали ПЦР на два локуса: 10 экзон RhD гена и 7 экзон RhCcEe и RhD генов. Продуктом амплификации 7 экзона с праймерами A1 и A2 был фрагмент ДНК размером 136 н.п., 10 экзона с праймерами A3 и A4 — 186 н.п. Фрагмент 136 н.п. служит внутренним контролем на эффективность проведения ПЦР. Фрагмент размером 186 н.п. маркером Rh-принадлежности пациента. Наличие после ПЦР фрагментов размером 136 и 186 н.п. характерно для Rh(+) людей, у Rh(-) индивидов наблюдается только фрагмент размером 136 н.п.

Всего было проведено 27 исследований крови доноров на Rh-принадлежность. Из них 13 человек оказалось Rh(+), 14 - Rh(-). Результаты ПЦР-тестирования на Rh-принадлежность совпали с данными серологического анализа в 100% случаев.

После проведенных предварительных исследований, с целью пренатальной диагностики проводили амниоцентез у Rh(-) беременных с Rh-аллоиммунизацией и высоким риском ГБП на сроке 20-37 недель. Для определения Rh-принадлежности плода методом ПЦР использовали ДНК амниоцитов. Параллельно определяли Vi в АЖ спектрофотометрическим методом. Rh-принадлежность новорожденного подтверждали после родов серологическим методом.

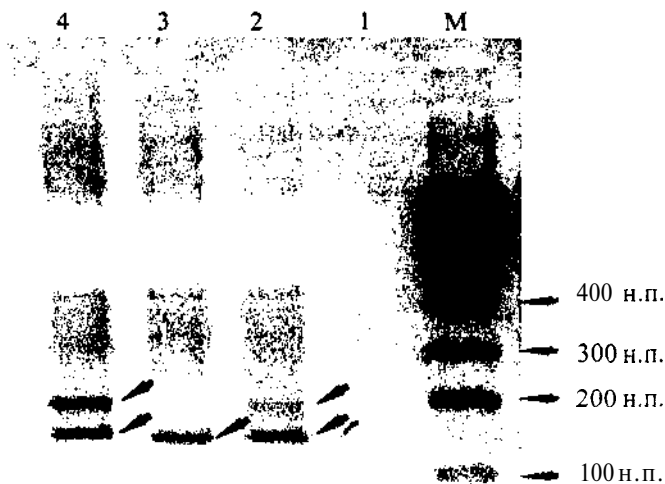


Рис. 2. ПЦР на RhD и RhCcEe локусы.

Дорожки: М - маркер (100-1000 н.п.); 1 - К(-); 2 - амниоциты плода (Rh(+)); 3 - кровь матери (Rh(-)); 4 - кровь отца (Rh(+)).

На рис. 2 представлены данные ПЦР на RhD и RhCcEe локусы. Как видно из рис. 2, у плода (дорожка 2) и отца (дорожка 4) после амплификации **присутствуют** фрагменты ДНК размером 136 и 186 н.п. У матери (дорожка 3) имеется продукт амплификации только 136 н.п. Таким образом, отец и плод имеют **RhD(+)** принадлежность, мать - **RhD(-)**. В данном случае возможен **Rh-конфликт** между матерью и плодом. В зависимости от уровня ААТ к РНК можно диагностировать возникновение ВФ или ПФ ГБП. По данным серологического анализа проведенного до ПЦР у отца была Rh(+), а у матери Rh(-) группа крови. Резус-статус плода, определенный пренатально методом ПЦР, был подтвержден серологическим методом после рождения ребенка.

Было исследовано 25 Ж. У 16 плодов было определено наличие 7 и 10 экзонов, у 9 - только 7 экзон. Уровень Vi в \Ж был повышен у 2 Rh(+) плодов и 1 Rh(-) плода, у 2 Rh(-) и 5 Rh(-) плодов уровень Vi в АЖ находился в границах нормы. Данные молекулярной диагностики в 100% совпадали с постнатальными серологическими исследованиями.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой корреляции между результатами ПЦР-анализа и серологическими методами. В некоторых случаях наблюдается повышение уровня Vi в АЖ и при Rh(-) плоде. Использование ПЦР на 7 и 10 экзонах позволяет избежать подобные ложноположительные результаты, а также диагностировать ПФГБН при нормальном уровне Vi в АЖ при Rh(+) плоде.

Комплексное определение уровня Vi спектрофотометрическим методом и Rh-принадлежности плода методом ПЦР при амниоцентезе может способствовать точной диагностике Rh-статуса плода, в выборе тактики лечения при высоком риске ГБП и оптимальных сроков родоразрешения.

Определение ABO-групп крови методом ПЦР и полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДФ)

Проводили амплификацию двух ABO-локусов: праймеры ABO1+ABO2 амплифицировали фрагмент размером 200 н.п., праймеры ABO3+ABO4 амплифицировали фрагмент размером 128 н.п. гена А-трансферазы).

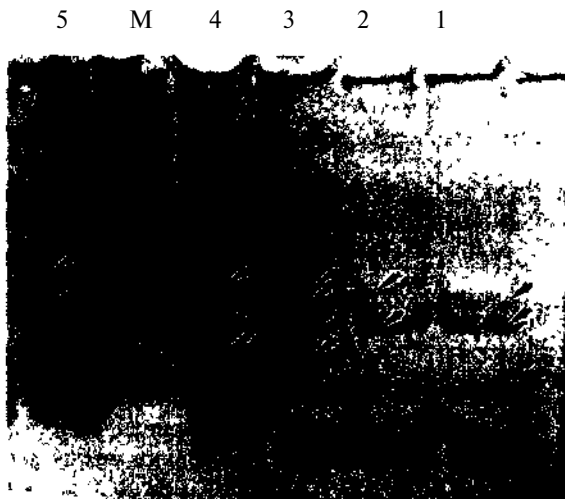


Рисунок 3. ПЦР-ПДФ на ABO-принадлежность.

Дорожки: 1 - ОО(I); 2 - АА(II); 3 - ВО(III); 4 - АВ(IV); 5 - АА(II); \1 - маркер (100-1000 н.п.)

Затем 10 мкл пробы после ПЦР (содержащую фрагменты ДНК 200 и 128 н.п.) инкубировали с рестриказами AluI и KpnI

распределение фрагментов ДНК после рестрикции показано на рисунке 3. На дорожках 1-5 расположены пробы крови доноров с группой ОО(I), АА(II), ВО(III), АВ(IV) и АА(II) соответственно. М - маркер (100-1000 нп).

Методом ПЦР-ПДФ было исследовано 20 проб крови у семейных пар (муж-жена). По результатам анализа 8 человек имели генотип ОО(I), 2 - АА(II), 5 - АО(II), 4 - ВО(III), 1 - АВ(IV). Данные совпали в 100% случаев с серологическими анализами.

Точное установление генотипа родителей по АВО-группам крови позволило, исходя из менделевского закона распределения гамет, прогнозировать все возможные варианты групп крови детей у этих семейных пар, что было достаточно важно для подбора донорской крови для переливания новорожденному при высоком риске осложнений при родах. Было также обследовано совместно с АВО-типированием отца и матери, 3 пробы АЖ на АВО-принадлежность плода. 2 плода имели генотип ОО(I), 1 плод - генотип АО(II). АВО-принадлежность крови у детей была подтверждена постнатально во всех случаях серологическим методом.

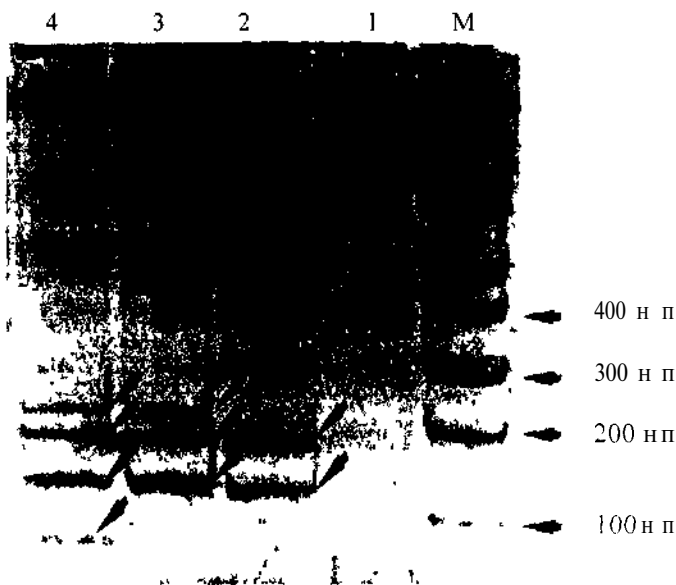


Рис 4 ПЦР-ПДФ на АВО принадлежность

Дорожки М - маркер (100-1000 нп) 1 - К(-) 2 - амниотическая жидкость плода (ОО(I)) 3 - кровь матери (АО(II)) 4 - кровь отца (ВО(III))

На рисунке 4 представлены данные ПЦР-ПДРФ на АВО-локусы. На дорожке 1 - отрицательный контроль (вода), на дорожках 2-4 - **амниоциты** плода, кровь матери и отца соответственно. Как видно из рисунка 4, у матери (дорожка 3) имеются продукты амплификации 3 фрагментов ДНК размерами - 200, 171 и 128 н.п., что соответствует группе крови **АО(II)**. У отца (дорожка 4) после амплификации обнаруживаются 4 фрагмента ДНК размерами - 200, 171, 128 и 88 н.п. Фрагмент ДНК размером 88 н.п. является специфичным для **В-аллеля**, фрагмент ДНК размером 171 н.п. соответствует **О-аллелю**. Следовательно, у отца группа крови **ВО(III)**. У плода (дорожка 2) после амплификации присутствуют фрагменты ДНК размером 171 н.п. и фрагмент размером 128 н. п., что соответствует группе крови **ОО(I)**. Таким образом, в данном случае не возникает риска развития у плода гемолитической болезни при АВО-несовместимости групп крови.

В результате проведенных исследований были определены допустимые пороги нормы по уровню ААТ к **НК** в сыворотке крови здоровых людей. На основании полученных норм, при обследовании беременных женщин с различными формами **ГБП**, были получены результаты, свидетельствующие о достоверном повышении уровня ААТ к **РНК** в сыворотке крови женщин при **ВФ** и **АФ** **ГБП**. Причем достоверное повышение уровня ААТ к **РНК** в сыворотке крови женщин при различных формах **ГБП** наблюдается со 2-й половины беременности. Данное обстоятельство делает весьма информативным и перспективным изучение уровня ААТ к **РНК** в сыворотке крови **беременных** женщин с риском **Rh-аллоиммунизации** с целью **пренатальной** диагностики **ВФ** **ГБП**. У **Rh(-)** женщин **АВО-аллоиммунизация** сопровождается наиболее высоким уровнем содержания ААТ к **РНК** в сыворотке крови. У **Rh-конфликтных** беременных **АВО-несовместимость** приводит к дополнительному увеличению уровня содержания ААТ к **РНК**, чем при **Rh-аллоиммунизации** без **АВО-конфликта**. Результаты наших исследований показали, что **ОАА** не влияет на выработку ААТ к **РНК** в сыворотке крови беременных женщин, то есть предшествующие осложненные беременности не являются возможной причиной присутствия ААТ к **РНК** в крови. Мы считаем, что все случаи повышения уровня ААТ к **РНК** являются результатом синтеза ААТ *de novo*.

Было показано, что выработка ААТ к **НК** у детей и их матерей происходит по различным направлениям. У матерей преобладают случаи повышенного уровня ААТ к **РНК** в сыворотке крови, а у их детей - ААТ к **дДНК** и одновременно к **дДНК** и **нДНК**. Практически во всех случаях повышения уровень ААТ к **НК** в сыворотке крови у детей был выше в 2 и более раза, чем аналогичные показатели у матерей. Нами было сделано предположение, что выработка ААТ к

НК у детей происходила уже до рождения, внутриутробно, независимо от матерей. Причины и механизмы этого феномена требуют отдельных исследований.

Апробированы и применены в клинической практике метод диагностики **Rh-статуса** и группы крови при помощи **ПЦР** и **ПДРФ**

Мы считаем, что комплексное определение уровня ААТ к РНК в сыворотке крови женщин со 2-й половины беременности, а также молекулярно-генетическое типирование **Rh-** и **ABO-** принадлежности плода, являются необходимыми критериями для точной диагностики **ГБП**, выбора тактики лечения и оптимальных сроков **родоразрешения**.

ВЫВОДЫ

1. Пороговые уровни ($\bar{X} \pm 2\sigma$ и $\bar{X} \pm 3\sigma$) содержания аутоантител к нуклеиновым кислотам в сыворотке крови здоровых доноров составили (в отн. ед.). к РНК - $0,95 \pm 0,50$ ($p < 0,05$) и $0,95 \pm 0,75$ ($p < 0,01$); к нДНК - $1,00 \pm 0,40$ ($p < 0,05$) и $1,00 \pm 0,60$ ($p < 0,01$); к дДНК - $1,12 \pm 0,40$ ($p < 0,05$) и $1,12 \pm 0,60$ ($p < 0,01$).
2. У здоровых рожениц уровень аутоантител к нуклеиновым кислотам в сыворотке крови достоверно не отличался от показателей здоровых доноров и составил (в отн. ед.): к РНК - $1,07 \pm 0,10$; к нДНК - $0,94 \pm 0,09$; к дДНК - $0,98 \pm 0,14$.
3. У иммуноконфликтных рожениц с внутриутробной и анемической формами гемолитической болезни плода наблюдалось достоверное повышение уровня аутоантител к РНК в сыворотке крови ($2,07 \pm 0,22$ и $1,56 \pm 0,18$ отн. ед. соответственно).
4. Показано, что наблюдаемое со 2-й половины беременности достоверное повышение уровня аутоантител к РНК ($1,48 \pm 0,10$ отн. ед.) в сыворотке крови у женщин с различными формами гемолитической болезни плода не зависит от отягощенного акушерского анамнеза.
5. Аллоиммунизация по АВО-антигенам сопровождается наиболее высоким уровнем содержания аутоантител к РНК в сыворотке крови **Rh(-)** рожениц ($3,55 \pm 0,81$ отн. ед.). У **Rh-конфликтных** беременных АВО-несовместимость приводит к дополнительному увеличению уровня содержания аутоантител к РНК ($1,96 \pm 0,19$ отн. ед.), чем при **Rh-аллоиммунизации** с АВО-совместимостью ($1,68 \pm 0,12$ отн. ед.).
6. Комплексное определение уровня аутоантител к РНК в сыворотке крови женщин с высоким риском аллоиммунизации начиная со 2-й половины беременности, генотипирование резус- и АВО- принадлежности плода методами полимеразной цепной реакции и полиморфизма длины рестрикционных фрагментов необходимы для точной диагностики гемолитической болезни плода, выбора тактики лечения и оптимальных сроков родоразрешения.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Абдрахманова Л.Р., **Зайнуллин А.А.**, Садыков Б.Г., Латыпов А.Ш. Молекулярно-генетическая диагностика резус-принадлежности плода по околоплодным водами при резус-изоиммунизации // Каз. Мед. Журнал. -1999. -Т. 80, N 4, -С. 300-301.
2. Зайнуллина А.С., Саттарова Л.И., **Зайнуллин А.А.**, Ишмухаметова Д.Г., Винтер В.Г. Иммуноферментное определение антител к РНК на полистироловых планшетах отечественного производства// Биотехнология. - 2000. - N 2. - С. 84-89.
3. **Зайнуллин А.А.**, Абдрахманова Л.Р., Латыпов А.Ш., Кузьмина Л.Ю., Садыков Б.Г. Пренатальная диагностика резус-принадлежности плода молекулярно-генетическим методом // II (IV) российский съезд медицинских генетиков. - Курск, 17-19 мая. - 2000. - С. 104-105.
4. Самойлова Л.Р., Бубис И.Г., **Зайнуллин А.А.** Важность сочетания методов кариологического и гибридизации *in situ* для уточнения диагноза // II (IV) российский съезд медицинских генетиков. - Курск, 17-19 мая. - 2000. - С. 224-225.
5. Абдрахманова Л.Р., Садыков Б.Г., **Зайнуллин А.А.** Ультразвуковые и молекулярно-генетические методы диагностики при резус-изоиммунизированной беременности // Каз. Мед. Журнал. - 2000. - N 5. - С. 427-430.
6. Abdrachmanova L.R., Sadykov B.G., **Zainullin A.A.** Molecular-genetical and biochemical methods of the rhesus status // Journal of Reproductive Immunology. Second International Conference on Experimental and Clinical Reproductive Immunobiology, Amsterdam, The Netherlands, 15-18 November. - 2000. - P. 124.
7. Саттарова Л.И., Зайнуллина А.С., **Зайнуллин А.А.**, Винтер В.Г., Ишмухаметова Д.Г. Обнаружение антител к РНК в сыворотке крови больных часто рецидивирующей рожей // Юбилейная конференция КНИИЭМ 1900-2000, Материалы конференции: Современные проблемы эпидемиологии, диагностики и лечения инфекционных и аллергических заболеваний. - Казань, 2000. - С. 62-63.
8. Абдрахманова Л.Р., **Зайнуллин А.А.**, Зайнуллина А.С. Уровень антител к нуклеиновым кислотам как иммунологический показатель проницаемости плацентарного барьера и степени поражения гемолитической болезни плода при резус-изоиммунизации // Медицинская иммунология. - 2002. - Т. 4, N 2. - С. 271.